

Aus der Medizinischen Universitätspoliklinik, Hebelstraße 1, Basel

Vorsteher: Prof. Dr. med. O. Gsell

Arbeit unter Leitung von Prof. Dr. med. A. Walser

Vergleichende Untersuchungen der Bestimmung von Glukose im Blut mit der O-Toluidin- und Hagedorn-Jensen-Methode

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Universität Basel

vorgelegt von

Patrick Ch. Gubitose
Bronxville, New York

Basel 1966

Druck: National-Zeitung AG, Basel

Von der Medizinischen Fakultät Basel
genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. O. Gsell

Tag der Promotion 4. Mai 1966



Eine Methode zur Bestimmung der Glukose im Blut, die exakt, spezifisch sowie einfach in der technischen Ausführung ist, nicht viel Zeit und Geld kostet, ist das Ziel vieler Ärzte seit Jahren. Mit der Ausarbeitung der O-Toluidin-Methode sind diese Wünsche weitgehend erfüllt worden. Das Problem der restreduzierenden Substanzen im Blut ist durch die O-Toluidin-Methode fast ausgeschaltet worden. Dies erlaubt nicht nur eine optimale Insulintherapie für die bekannten Diabetiker, sondern ist auch ein wichtiges Hilfsmittel zur Entdeckung und Behandlung der sogenannten Grenzfälle (prä oder latente Diabetiker), wo eine exakte Blutzuckerbestimmung unerlässlich ist.

Es gibt drei grundlegende Arten, Blutzucker zu bestimmen (5):

1. Die Redoxmethode, welche sich auf die Fähigkeit von Glukose und anderen Substanzen stützt, metallische Ionen wie Kupfer und Eisen zu reduzieren. Dies kann entweder kolorimetrisch oder durch Titrieren in Glukosewerte umgerechnet werden. Da diese Methode auch andere Substanzen als Glukose miterfaßt ergibt sich ein Nachteil, wenn es darum geht, die wahren Glukosewerte zu finden. Andere Substanzen welche mitreduzierend wirken sind Glutathion, Glukuronsäure, Vitamin C, Harnsäure, Kreatinin und eine Reihe von Medikamenten wie Salizylate, Barbiturate, Penicillin, Tetracyclin, INH, PAS etc. (3, 7, 11, 22). Die Resultate dieser Bestimmungen sind daher höher als diejenigen der sogenannten wahren Glukose. Zwei gute Methoden dieser Art sind die Nelson-Somogij-Methode, bei welcher die anwesenden Kupfer⁺⁺-Ionen durch die reduzierenden Substanzen zu Kupfer⁺ oxydiert werden, welches seinerseits Arsenmolybdänsäure (je nach Modifikation Phosphormolybdänsäure) zu Molybdänblau reduziert, was kolorimetrisch erfaßt werden kann (18, 21), und die Hagedorn-Jensen-Methode, die ein proteinfreies Filtrat in einer kochenden Kaliumferrizyanidlösung verwendet, wobei titrimetrisch der Überschuß an Ferrizyanid in der Säurelösung bestimmt wird (8). Diese Methoden erfordern jedoch mehrere Schritte und Reagentien neben ihrer nicht absoluten Genauigkeit.

2. Die zweite Methode ist die enzymatisch spezifische Bestimmung von Glukose mit Glukoseoxydase. Das durch Einwirkung von Glukoseoxydase entstehende H_2O_2 oxydiert mittels Peroxydase ein Chromogen (O-Dianisidin). Die Intensität des sich dabei bildenden braunen Farbstoffes entspricht dem Glukosegehalt und ist kolorimetrisch oder photometrisch meßbar (9). Diese Methode ist heute auch für klinische Routinelaboratorien standardisiert worden (10, 14, 17, 19, 24). Sie ist ebenfalls für verschiedene restreduzierende Substanzen empfindlich (z. B.

Ascorbinsäure, Harnsäure, Glutathion und peroxydhaltige Waschmittel) (22), Fehlerquellen sind Temperaturschwankungen, pH, Reaktionszeit und Reinheit des Enzyms, wie bei anderen enzymatischen Reaktionen. Aus diesem Grunde ist die sonst chemisch ideale Methode für die Praxis nur bei Einhalten aller Bedingungen zu empfehlen.

3. Die dritte Methode ist eine Kondensations-Reaktion (durch starke Ansäuerung) in welcher ein Abbauprodukt von Glukose (Furfural oder seine Derivate) sich mit einem Farbstoff verbinden, der für dieses Produkt spezifisch ist und eine Farbreaktion erzeugt, die kolorimetrisch gemessen werden kann. O-Toluidin erwies sich nach sorgfältiger Untersuchung als das beste Agens in dieser Gruppe. Viele Versuche haben gezeigt, daß es sich dabei um eine sehr genaue und einfache Methode in ihrer Ausführung handelt (2, 12, 13, 24).

In dieser Arbeit wurde zu Vergleichszwecken bei Patienten der Blutzucker sowohl mit der Hagedorn-Jensen- als auch mit der O-Toluidin-Methode bestimmt.

Das Krankengut besteht aus 120 Patienten aus dem Ambulatorium der Medizinischen Universitätspoliklinik, Basel (Direktor: Prof. Dr. O. Gsell), mit verschiedenen Krankheiten, darunter Fälle mit leichtem bis mittelschwerem Diabetes. Seren von Patienten mit schweren Nieren- und Leberleiden sowie solchen mit diabetischer Acidose wurden bei unseren Untersuchungen nicht verwendet. Alle Blutproben wurden nüchtern am Morgen als Kapillarblut aus dem Finger entnommen.

Methoden

1. Bei der *Hagedorn-Jensen-Methode* wird das Blut in einer kolloidalen Lösung von Zinkhydroxyd unter Erhitzen enteiweißt. Das Filtrat wird anschließend mit genau eingestellter Kaliumferrizyanidlösung versetzt und während 15 Minuten im Wasserbad gekocht. Dabei reduziert die Glukose das Kaliumferrizyanid in Kaliumferrozyanid, das überschüssige Kaliumferrizyanid wird jodometrisch bestimmt.

Arbeitsvorschrift:

Reagentien:

1. ZnSO_4 0,45 %
2. NaOH n/10
3. $\text{Fe}(\text{CN})_6\text{K}_3$ n/200 (1,65 g Kaliumferrizyanid) in eine dunkle Flasche geben, in 200–300 ccm Aqua dest. auflösen. Eine Lösung von 10,6 g Na_2CO_3 in 200–300 ccm Aqua dest. auflösen und die Lösung der Mischung von Ferrizyanid beigegeben. Darauf mit Aqua dest. zu einem Liter auffüllen.
4. Lösung von $\text{ZnSO}_4\text{-KJ-NaCl}$ (45 g ZnSO_4 und 225 g NaCl) auf ein Liter Lösung. 2,5 g KJ in 100 ccm der vorhergehenden Lösung ergibt Lösung Nr. 4.
5. Essigsäure 3 %.

6. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ n/200 aus einer Lösung (n/10) stabilisiert mit 3,8 g Borax/ltr.
7. 1 % Stärke in 30 % NaCl.
8. KJO_3 n/200 um die Thiosulfatlösung zu titrieren (0,1783 g KJO_3 /ltr).

Analyse:

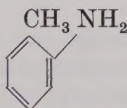
In 3 Reagenzgläser von 10 ccm Inhalt gibt man 5 ccm 0,45 %ige ZnSO_4 -Lösung und 1 ccm NaOH n/10. Das auf Spezialpapier gezogene Blut (ca. 100 mg) wird auf 2 Gläser verteilt, das dritte Glas dient als Leerwert und erhält ein Papier ohne Blut. Die drei so vorbereiteten Gläser werden nun 3–5 Minuten im Wasserbad gekocht und darauf filtriert. Wenn die ganze Flüssigkeit filtriert ist, werden die Gläser zweimal mit einer Wassermenge, die gerade ausreicht um das Papier zu erreichen, gewaschen. Darauf werden genau 2 ccm Ferrizyanid n/200 dazugegeben und während einer Viertelstunde im Wasserbad gekocht. Die Flüssigkeiten müssen gelb bleiben, d. h. einen Überschuß an Ferrizyanid aufweisen. Ist dies nicht der Fall, so müssen nochmals 2 ccm zugefügt werden und weitere 10 Minuten gekocht werden. Nachdem man die Flüssigkeit durch Eintauchen in kaltes Wasser abgekühlt hat, gibt man jedem Glas 2 ccm Essigsäure, 3 ccm $\text{KJ-ZnSO}_4\text{-NaCl}$ -Lösung bei und titriert mit Natriumthiosulfat bis die Lösung hellgelb wird. Nun fügt man 2 Tropfen Stärke zu und titriert weiter, bis die jetzt blaue Lösung farblos wird. Der Titer der Thiosulfatlösung wird mit 2 ccm KJO_3 n/200, 3 ccm Lösung 4 und 2 ccm CH_3COOH 3 %ig bestimmt.

Berechnung:

98 mg Blut abwägen. Für die Analyse 1,22 ccm Thiosulfat und die Leerprobe 1,83 ccm. Der Thiosulfatfaktor ist 1,96, infolgedessen werden wir haben:

Blutbestimmung	Leerprobe
$1,22 \times 1,96 = 1,245$	$1,83 \times 1,98 = 1,87$
mg Glukose nach Tabelle	
ergibt 133	22
Wert minus Wert der Leerprobe	
$133 - 22 = 111$ mg Glukose	
$\text{mg \% Glukose} = \frac{111 \times 100}{98} = 113 \text{ mg \% Blutzucker}$	

2. O-Toluidin Methode: O-Toluidin



ist eine farblose Flüssigkeit, die sich an Luft und Licht allmählich rotbraun färbt und in Wasser wenig löslich ist. Sie verbindet sich mit Glukose und färbt sich dabei blaugrün an, was kolorimetrisch abgelesen werden kann. Durch Beigabe von Thioharnstoff (13) zum Reagens stabi-

liert sich die Anfärbung und verhält sich nach dem Lambert-Beerscher-Gesetz. Die Reaktion ist für Aldosen und Hexosen spezifisch.

Arbeitsvorschrift:

Reagentien:

1. Trichloressigsäure 3 %

2. Farbreagens

1,5 g Thioharnstoff (Merck) in

940 ml Eisessig lösen

60 ml O-Toluidin (möglichst farblos)

dazugeben. Mischen.

Das Reagens soll möglichst farblos sein. In einem braunen Behälter und vor Sonnenlicht geschützt hält das Reagens mindestens 2 Monate.

3. Benzoesäure 0,2 % (Merck)

4. Glukose-Standard

100 mg Glukose auf

100 ml Benzoesäure (bei Zimmertemperatur unbeschränkt haltbar).

Zur besseren Genauigkeit kann ein Glukose-Standard aus 1 ml Standard-Stammlösung und 10 ml Trichloressigsäure hergestellt werden, der mindestens eine Woche haltbar und für weitere Analysen verwendbar ist.

Analyse:

0,1 ml Blut (oder andere zu analysierende Lösung) mit 1,0 ml Trichloressigsäure mischen und einige Minuten stehen lassen, zentrifugieren. 0,5 ml der überstehenden Lösung mit 4,5 ml Farbreagens (aus Glasbürette), vorzugsweise Doppelwerte, mischen. 8 Minuten in siedendes Wasser, unter Abzug oder in Kapelle, abkühlen lassen. Die blaugrüne Farbe wird in einem Spektrophotometer bei 630 m μ oder in einem Kolorimeter mit dem entsprechenden Filter gegen den Leerwert, bestehend aus Trichloressigsäure abgelesen. Dasselbe wird mit einem oder besser zwei Glukose-Standards, bestehend aus 100 mg und 200 mg/100 ml, gemacht.

Berechnung:

$$\frac{\text{Extinktion Analyse}}{\text{Extinktion Standard}} \times \frac{\text{Glukose Konzentration}}{\text{in Standard in mg \%}} = \text{mg \% Glukose}$$

Normalwerte:

66 — 93 mg % resp.

79,5 $\pm$ 13,5 ($\pm$ 2s)

Angewandte statistische Methoden

Der Sinn unserer Statistik liegt in der Wiederlegung der Nullhypothese d. h. zu zeigen, daß ein nicht zufälliger Unterschied der Kontrollen

(O-Toluidin) und der Prüfgruppe (Hagedorn-Jensen) vorliegt. Dies geschieht mit der Berechnung der zufälligen Streuung und beobachteten Differenzen (siehe unten). Dazu haben wir zwei Methoden angewandt, die Regressionskurvenanalyse (Formel 2-8) und Berechnung der Streuung der Mittelwerte der Differenzen (Formel 10-11).

Die Formel für jede gerade Linie heißt: $y = a + bx$, wobei a dem Schnittpunkt der Geraden mit der y Achse und b der Steigung der Geraden entspricht. Mit anderen Worten sollte jede graphisch dargestellte Linie den gleichen Wert für x wie y ergeben, wenn $a = 0$ und $b = 1$ ist und die Linie durch den Schnittpunkt verläuft. In den folgenden Formeln steht x für O-Toluidin und y für Hagedorn-Jensen.

1. Durch Anwendung der Formel

$$r = \sqrt{\frac{N\Sigma xy - \Sigma x \Sigma y}{\{N\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2\} \{N\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2\}}} \quad (\text{Formel 1})$$

wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen den beiden Methoden besteht.

2. Mit der Regressionsformel $a = \bar{y} - b\bar{x}$ wo $\bar{y}$ der Durchschnitt aller Hagedorn-Jensen-Werte und $\bar{x}$ derjenige der O-Toluidin-Werte bedeutet, finden wir a nachdem wir b durch die Formel

$$\frac{\Sigma xy - \bar{x}\Sigma y}{\Sigma x^2 - \bar{x}(\Sigma x)} \quad (\text{Formel 2})$$

bestimmt haben.

3. Durch die Bestimmung der Standardabweichung a (S_a) (Formel 3) und b (S_b) (Formel 4) mit den Formeln

$$S_a = \sqrt{\frac{\Sigma x^2}{n\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2}} \quad S_b = \sqrt{\frac{S^2}{\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2/n}}$$

$$\text{wenn } (n-2)S^2 = \Sigma y^2 - \frac{(\Sigma y)^2}{n} - \frac{\left(\Sigma xy - \frac{\Sigma x \Sigma y}{n}\right)^2}{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}} \quad (\text{Formel 5})$$

kommen wir auf die Werte von a und b im Verhältnis zu ihrer Streuung mit Hilfe der Formel

$$t = a/S_a, \quad t = \frac{1-b}{S_b} \quad (\text{Formel 6 und 7})$$

und können damit zeigen, daß eine signifikante Differenz zwischen den beiden Methoden besteht, sofern a genügend von 1 abweicht und b von 0. Die Streuung der einzelnen Punkte um die Gerade beträgt

$$S_{xy} = \sqrt{\frac{\Sigma y^2 - \{a\Sigma x + b\Sigma(xy)\}}{N}} \quad (\text{Formel 8}),$$

was der gestrichelten Linie der Regressionskurve entspricht.

4. Die Standardabweichung der Differenzen wird mit der Formel

$$SD = \sqrt{\frac{d^2}{N-1}} \quad (\text{Formel 9})$$

gefunden, worin d^2 der Summe der Quadrate der Differenzen zwischen den beiden Methoden entspricht und N der Anzahl gruppierter Proben. Die Signifikanz der Differenzen zwischen den beiden Methoden wird mit Hilfe der Formel

$$SD = \sqrt{\frac{N \sum D^2 - (\sum D)^2}{N^2 (N-1)}} \quad (\text{Formel 10})$$

$$\text{und } t_0 = \frac{\bar{D}}{SD} \quad (\text{Formel 11})$$

gefunden, wobei D die Summe der Differenzen, $\bar{D}$ der Mittelwert der Differenzen und SD die Streuung der Mittelwerte der Differenzen und t_0 die Wahrscheinlichkeit eines zufälligen Eintreffens der Resultate mit Hilfe der t (Student) Tabellen ergibt (15, 19, 23).

Resultate

1. Normalwerte von 31 Personen mit der O-Toluidin-Methode: Der Mittelwert beträgt 79,5 mg %, wobei 54,8 % aller Werte zwischen 72,6 mg % und 86,2 mg % liegen ($x \pm S$) und 96,7 % zwischen 65,7 mg % und 93,3 mg % Glukose ($x \pm 2S$). Die Standardabweichung betrug 6,8 mg % wenn

$$SD = \sqrt{S^2} \quad \text{und} \quad S^2 = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{N}$$

waren. Die Normalwerte ($x \pm 2S$) befinden sich im Bereich von 66 mg % — 93 mg %.

2. Bei den O-Toluidin-Doppelbestimmungen (92 Proben) fand sich eine Standardabweichung von $\pm 2,96$ mg %.

3. Vergleich zwischen O-Toluidin- und Hagedorn-Jensen-Methode:

a) Der Korrelationskoeffizient (Formel 1) ergab einen Wert von $r = 0,99817$.

b) Die Bestimmung der Regressionskurve zeigte Werte für den Schnittpunkt der Geraden (a) = 4,6 und der Neigung der Geraden (b) = 1,08 bei einer Standardabweichung von a (S_a) = 0,9731 (Formel 3) und b (S_b) = 0,00378 (Formel 4). Ferner betrug die Signifikanzschränke der obengenannten Variablen für t_a 4,06 (Formel 6) und für t_b 21,3 (Formel 7) was einer Wahrscheinlichkeitsberechnung (Student-Tab.) von $p < 0,0005$ für a den Schnittpunkt und $p < 0,0001$ für b die Steigung ergibt. Die Streuung der einzelnen Punkte um die Regressionskurve beträgt $S_{xy} = \pm 9,9$ (Formel 8).

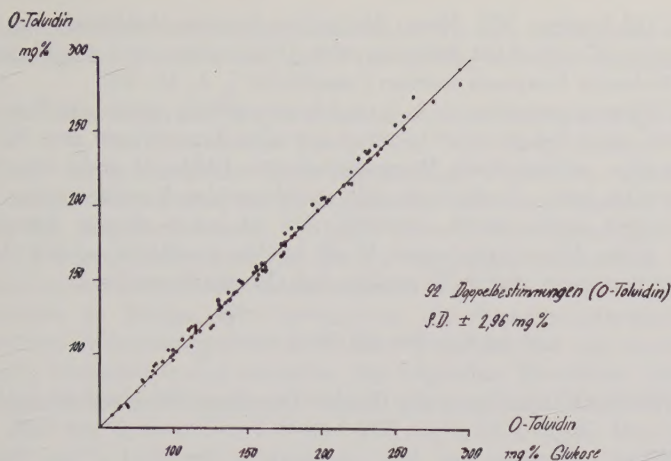


Abb. 1

c) Die Standardabweichung der Differenzen von 120 Patientenserien die mit der O-Toluidin- und Hagedorn-Jensen-Methode geprüft wurde, ergab 15,6 mg % (Formel 9). Es bestand ferner ein t_0 für die korrelierbaren gepaarten Differenzen von 13,5, wo $\bar{D} = 18,6$ und $S_D = 1,33$ (Formel 10 und 11) mit einer Wahrscheinlichkeitsberechnung von $p < 0,0001$.

Diskussion

Die Normalwerte der O-Toluidin-Methode sind niedriger als die der Nelson-Somogij-Methode in einer größeren Serie (65–110 mg %) für Nüchternblut bei 95 % Individuen (2). Dies ist zum Teil der größeren Spezifität der O-Toluidin-Methode zuzuschreiben. Unsere Werte gleichen denjenigen von Hyvärinen und Nikkilä (13) welche 63–87 mg % in 95 % der Fälle zeigten.

Die Standardabweichung bei 92 Kontrollen (Abb. 1) betrug $\pm 2,96$ mg %, welche mit derjenigen von Dubowski (2) 2,0 mg % bei gesammeltem heparinisiertem Blut und denjenigen von Hyvärinen und Nikkilä (13) von 3,6 mg % bei 21 Doppelbestimmungen verglichen werden kann.

Obwohl zwischen beiden Methoden eine sehr signifikante Korrelation vorhanden ist ($r = 0,99817$) (Formel 1) zeigt die Regressionslinie, daß die Hagedorn-Jensen-Methode immer höhere Werte als die O-Toluidin-Methode ergibt. Der statistische Beweis der Regressionskurve zeigt, daß eine signifikante Differenz zwischen der Hagedorn-Jensen- und O-Toluidin-Methode besteht. Die Wahrscheinlichkeitsberechnung $p < 0,0005$ für t_a (Formel 6) und $p < 0,0001$ für t_b (Formel 7) zeigt, daß a von 0 mehr abweicht als von der analytischen Fehlergrenze erlaubt ist und b mehr von 1 als erwartet wenn S_b berücksichtigt wird. Ferner konnten wir die Nullhypothese nochmals widerlegen, indem wir einen hochsignifikanten Wert von $p < 0,0001$ für die Streuung gepaarter Differenzen

(Formel 11) fanden. Mit diesen Methoden konnte statistisch ein hochsignifikanter Unterschied zwischen der O-Toluidin- und der Hagedorn-Jensen-Methode bewiesen werden (vergleiche 1, 4, 16, 22).

Die Differenz zwischen Abb. 2 und 3 ist auffällig, indem in der ersten die Werte nahe beieinander in einer geraden Linie durch den Schnittpunkt laufen, während die Regressionskurve (Abb. 2) nicht durch den Schnittpunkt geht, obschon sie mit zunehmender Konzentration mehr oder weniger arithmetisch verläuft. Es ist nach diesen Resultaten möglich jeden Hagedorn-Jensen-Wert in den zuständigen O-Toluidin-Wert umzurechnen, durch Umstellen der Originalformel von

$$y = a + bx \text{ auf } ab x = \frac{y - a}{b},$$

wobei x für die O-Toluidin- und y für die Hagedorn-Jensen-Methode steht.

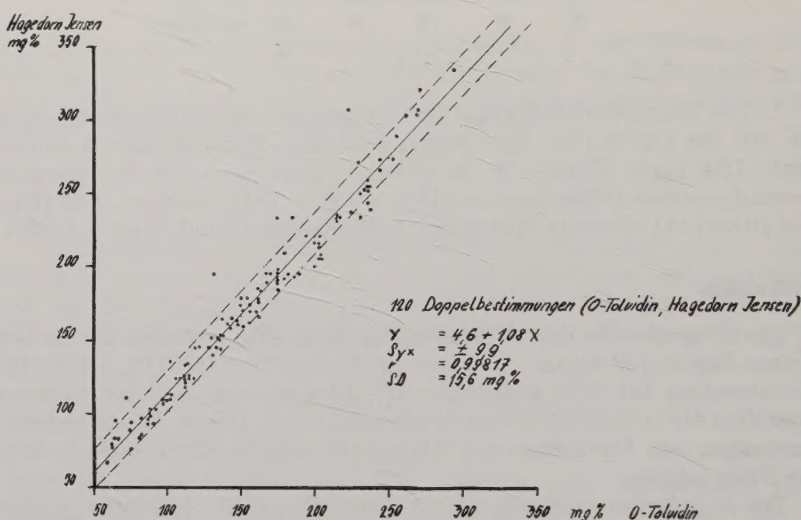


Abb. 2

Abb. 2

Beispiel: Wenn ein Hagedorn-Jensen-Wert 100 mg% beträgt (y) erhält man einen korrespondierenden O-Toluidin-Wert von 88,3 mg%, eine Differenz von 11,7 mg% ($x = y - 4,6 : 1,08$) unserer Werte entsprechend. Diese Umrechnung sollte allerdings nicht bei schweren Fällen von Diabetes oder Nierenversagen, wo andere restreduzierende Substanzen mitspielen, verwendet werden, da diese die Hagedorn-Jensen-Methode bekanntlich schwer beeinträchtigen und wir keine solchen Fälle untersucht haben, obwohl diese Umrechnung bei leichten Diabetikern gut angewandt werden kann. Es möchte noch erwähnt sein, daß Stereoisomeren von Glukose wie Galaktose und Mannose die O-Toluidin-

Methode erheblich beeinflussen können, z. B. bei Galaktosämien einer Erkrankung bei Kindern und bei Verwendung von Lävuloseinfusionen (2, 24).

Beim Betrachten der Regressionskurve sollte berücksichtigt werden, daß ca. 13 % der Einzelwerte (meist über 150 mg % Glukose liegend) außerhalb der gestrichelten Linie liegen (S_{xy}) (Formel 8), was auf mitreduzierende Substanzen, die ja bekanntlich mit zunehmender Konzentration die Hagedorn-Jensen-Methode schwer beeinträchtigen, zurückgeführt werden könnte (9). Um dies zu bekräftigen versuchten wir eine Korrelation zwischen der Konzentration von Blutzucker und diesen Substanzen zu finden. Wir bestimmten die Standardabweichung der Differenzen (Formel 9) zwischen beiden Methoden für alle zusätzlichen 50 mg % Blutzucker und erhielten die folgenden Resultate: für Werte zwischen 50 und 100 mg % 14,7 mg % Glukose, zwischen 100 und 150 mg % 20,6 mg %, zwischen 150 und 200 mg % 22,2 mg %, zwischen 200 und 250 mg % 18,6 mg %, zwischen 250 und mehr 45,1 mg % (nur 9 Fälle). Diese Werte untermauern die Hypothese einiger Autoren, daß mit zunehmender Konzentration der Glukose auch die restreduzierenden Substanzen im Blut ansteigen (3, 6, 7, 11, 14, 17, 19, 22).

Zusammenfassung

Nach einer kurzen Beschreibung der drei heute gebräuchlichsten Methoden zur Bestimmung von Glukose im Blut werden die Resultate einer Vergleichsuntersuchung zwischen der Hagedorn-Jensen- und O-Toluidin-Methode mitgeteilt. Es wurde dabei statistisch ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Methoden nachgewiesen, wobei die Hagedorn-Jensen-Methode immer höhere Werte (ca. 12 mg %/100 mg Glukose) ergab. Dabei war es möglich durch die Formel

$$x = \frac{y - 4,6}{1,08}$$

aus den Hagedorn-Jensen-Werten die entsprechenden O-Toluidin-Werte, welche der wahren Glukose näher sind, zu berechnen. Die Hypothese einiger Autoren, daß mit zunehmender Konzentration von Glukose auch die restreduzierenden Substanzen im Blut ansteigen, konnte bestätigt werden.

Summary

Following a short description of the three current methods for determining blood glucose we compared O-Toluidine and Hagedorn-Jensen method. We were able to statistically prove a significant difference in both methods, Hagedorn-Jensen always giving higher values (appr. 12 mg %) in 100 mg Glucose. We proposed the formula

$$x = \frac{y - 4,6}{1,08}$$

to convert Hagedorn-Jensen values into those of O-Toluidine which is closest to the true glucose value. Finally our values seem to support the hypothesis of some authors correlating blood glucose concentration with the other reducing substances in the blood.

Literatur

1. *Bobinski, H. and Przedlocki, J.*: Blood Sugar Estimation by the Hagedorn-Jensen Method, Enzymatic and O-Toluidin Method. *Pol. Med. J.* 433, (1962)
2. *Dubowski, K. M.*: An O-Toluidine Method for Body Fluid Glucose Determination. *Clin. Chem.* 8, 215, (1962)
3. *Fashena, G.*: On the Nature of the Saccharoid Fraction of Human Blood. *J. Biol. Chem.* 100, 357, (1933) und 137, 21, (1941)
4. *Fried, R. und Hoeflmayr, J.*: Eine Kolorimetrische Methode zur Blutzuckerbestimmung. *Ärztl. Lab.* 10, 59, (1964)
5. *Förster, H.; Mehnert, K. und Stuhlfauth, K.*: Laboratoriumsmethoden zur Erkennung und Kontrolle des Diabetes mellitus. *Münch. med. Wschr.* 30, 1441, (1965)
6. *Frank, H. und Kirberger, J.*: Eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung der « wahren Glukose » und Galaktose in 0,05 cem Blut. *Biochem. Z.* 320, 359, (1950)
7. *Fujita, A und Iwatake, D.*: Bestimmung des echten Blutzuckers ohne Hefe. *Biochem. Z.* 242, 43, (1931)
8. *Hagedorn, H.C. und Jensen, B.N.*: Zur Mikrobestimmung des Blutzuckers mittels Ferrizyanid. *Biochem. Z.* 135, 46, (1923) und 137, 92, (1925)
9. *Hallmann, L.*: Klinische Chemie und Mikroskopie. G. Thieme Verlag 1958, pg 533
10. *Hill, J.*: An Automated Determination of Glucose utilizing a Glucose Oxydase-peroxydase System. *J. Lab. clin. Med.* 57, 970, (1961)
11. *Hüller, A.; Linder, G. and Van Slyke, D.*: The Reducing Substances of the Blood. *J. Biol. Chem.* 64, 625, (1925)
12. *Hultman, E.*: Rapid Specific Method for Determination of Aldosaccharides in Body Fluid. *Nature* 183, 108. (1959)
13. *Hyvärinen, A. and Nikkilä, E.*: Specific Determination of Blood Glucose with O-Toluidine. *Clin. Chim. Acta* 7, 140, (1962)
14. *Jakobsen, K.*: Quantitative Determination of Blood Glucose Using Glucose Oxydase and Peroxydase. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 12, 76, (1960)
15. *Johnson, P.*: Statistical Methodes in Research. Prentice Hall 1950, pg 75
16. *Mehnert, H. und Förster, H.*: Ist die O-Toluidin-Reaktion zur Blutzuckerbestimmung in der Praxis brauchbar? *Dtsch. med. Wschr.* 52, 2342, (1965)
17. *Middleton, B. and Griffeth, W.*: Rapid Colorimetric Micromethod for Estimating Glucose in Blood and C.S.F. Using Glucose Oxydase. *Brit. med. J.* 2, 1525, (1957)
18. *Nelson, N.*: A Photometric Adaption of the Somogji Method for Determination of Glucose. *J. Biol. Chem.* 153, 375, (1957)
19. *Richterich, R.*: Klinische Chemie. S. Karger, Basel 1965, pg 24
20. *Seifer, M. und Gerstenfeld, S.*: The Photometric Microdetermination of Blood Glucose with Glucose Oxydase. *J. Lab. clin. Med.* 51, 448, (1958)
21. *Somogji, M.*: Determination of Blood Sugar. *J. Biol. Chem.* 160, 69, (1945) und 86, 655, (1930)
22. *Schmidt, F.*: Enzymatische Methoden zur Bestimmung von Blut- und Harnzucker unter Berücksichtigung von Vergleichsuntersuchungen mit klassischen Methoden. *Internist* 12, 554, (1963)
23. *Youdin, W.J.*: Statistical Methods for Chemists. Wiley Publ. 1955, pg 40
24. *Zender, R.*: Analyse Quantitative des Aldohexoses. *Clin. Chim. Acta* 8, 355, (1963) – Micro-analyse Automatique des Aldohexoses dans les Liquides Biologiques par l'O-Toluidine. *Clin. Chim. Acta* 11, 85, (1965)

